

# HSV-TK 基因逆转录病毒重组体的构建和鉴定<sup>①</sup>

谢文练<sup>1,②</sup> 梁正东<sup>2</sup> 吕凌<sup>3</sup>

(中山医科大学 1 孙逸仙纪念医院泌尿外科 2 孙逸仙纪念医院妇产科  
3 分子医学实验中心; 广州, 510120)

**摘要** 利用逆转录病毒载体 pLNSX 构建了带 HSV-TK 基因的逆转录病毒重组体 pLNS-TK, 用磷酸钙沉淀法转染 PA317 包装细胞, 经 G418 筛选抗性克隆, 建立了产生重组病毒的载体产生细胞系 PA317/TK, 用 NIH3T3 细胞测定病毒(CFU)滴度为  $3 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 。提取 PA 317/TK 细胞的 DNA 和细胞上清液的 RNA, 在特异性引物引导下, 分别用 PCR 和 RT-PCR 检测证实 PA317/TK 细胞整合了 HSV-TK 基因并产生重组病毒, 为 HSV-TK 基因治疗恶性肿瘤的实验研究打下了基础。

**主题词** 单纯病毒属/遗传学; 胸苷激酶/遗传学; 逆转录病毒/遗传学; 重组/遗传

中图分类号 Q 78

单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK)基因是肿瘤基因治疗中最常用的“自杀基因”, 实验研究显示把 HSV-TK 基因导入肿瘤细胞结合抗病毒药物更昔洛韦(ganciclovir)治疗, 可杀伤肿瘤细胞和使实体瘤完全消退<sup>[1,2]</sup>。我们应用基因工程技术, 构建了带 HSV-TK 基因的逆转录病毒重组体, 导入包装细胞, 建立了产生重组病毒的载体产生细胞系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

pHSV-106 带单纯疱疹 I 型病毒的胸苷激酶基因, GIBCO/BRL 公司。pLNSX 逆转录病毒载体, PA317 包装细胞和小鼠成纤维细胞 NIH3T3, 本校分子医学中心保存。各种内切酶, *Bam*HI、*Hind*III、*Sac*I, Promega 公司。Klenow 酶, GIBCO/BRL 公司。T4 DNA 连接酶, New England Biolabs 公司。营养液 RPMI 1640, GIBCO/BRL 公司。G 418, Boehringer-Mannheim 公司。反转录和 PCR 药盒 Promega 公司。地高辛素(DIG)标记检测试剂盒, Boehringer Mannheim 公司。

### 1.2 带 HSV-TK 基因的逆转录病毒重组体的构建

质粒 pHSV-106 带 HSV-TK 的 cDNA, 全长 7.76 kb, 其中 HSV-TK 的 cDNA 位于 *Bam*HI 的酶切位点中, 全长 3.4 kb。逆转录病毒载体 pLNSX 全长 6.1 kb,

含选择基因 Neo<sup>R</sup> 带 SV40 启动子, 其下游有 *Hind*III 等单克隆位点。把 HSV-TK 基因与逆转录病毒载体 pLNSX 连接构建带 HSV-TK 基因的逆转录病毒重组体。

用 *Bam*HI 酶切质粒 pHSV-TK, 得到带 HSV-TK 的 cDNA, 全长 3.4 kb, 低熔点琼脂糖回收该酶切片段, 用 Klenow 酶补平末端。逆转录病毒载体 pLNSX 用 *Hind*III 酶切, 用 Klenow 酶补平末端。把目的基因 HSV-TK 和逆转录病毒载体 pLNSX 用 T4 连接酶 18 °C 连接 14 h。连接产物在钙化菌 JM 109 中转化, 转化的 JM 109 涂布于含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板, 37 °C 培养 16 h。在 LBA 琼脂平板共挑取 56 个细菌菌落接种到含氨苄青霉素的 LB 培养基中扩增质粒。用碱裂解法提取质粒 DNA。

### 1.3 pLNS-TK 重组体的鉴定

HSV-TK 基因位于 2 304 bp 处有一个 *Sac*I 酶切位点, 逆转录病毒载体 pLNSX 在 558 bp 和 3 613 bp 处有二个酶切位点, 因此重组体 pLNS-TK 正向插入用 *Sac*I 酶切后可以形成 2 767 bp, 3 094 bp 和 3 875 bp 3 个片段。

### 1.4 逆转录病毒载体产生细胞系 PA 317/TK 细胞的建立

用磷酸钙介导的贴壁细胞通用转染法把 HSV-TK 基因逆转录病毒重组体导入双嗜性包装细胞 PA 317, 经 G 418(600 mg/L)筛选 2 周后形成抗 G 418 的细胞

① 中山医科大学科研基金资助课题; ② 第一作者, 1962 年出生, 男, 博士, 主治医师

克隆。挑取单个克隆转入小方瓶继续用 G 418 选择培养。选择后的 PA 317 细胞具有 G 418 抗性。

### 1.5 重组逆转录病毒滴度的测定

用 PA 317/TK 细胞的病毒上清液感染 NIH 3T3 细胞,经 400 mg/L 的 G 418 筛选,按第 3 周形成的细胞克隆数计算病毒的滴度。

### 1.6 细胞逆转录病毒包装细胞系 PA317/TK 细胞的鉴定

提取 PA317/TK 细胞的 DNA,与 DIG 标记的 HSV-TK 基因 cDNA 探针进行打点杂交,带 HSV-TK 基因的质粒 pHSV-106 作阳性对照,不含 HSV-TK 基因的质粒 pLNSX 作阴性对照。

### 1.7 PA317/TK 细胞上清液病毒 RNA 的鉴定

设计能扩增 HSV-TK 240 bp 基因片段(374 ~ 614 bp)。

引物二条:引物 1 5' ATAGCAACCGACGTACG 3'  
引物 2 3' GTTAGCGCTTGATAGT 5'

取 PA317/TK 细胞上清 100  $\mu$ L,用异硫氰酸胍一步法提取病毒 RNA,用反转录酶把 RNA 反转录成 DNA,在 HSV-TK 基因的特异引物引导下进行聚合酶链式反应。在 50  $\mu$ L 的反应体积内加入逆转录产物 1  $\mu$ g,5 $\times$ PCR 缓冲液,引物 2  $\mu$ L,10 $\times$ dDTP, Taq 酶 2 U,90  $^{\circ}$ C 变性,55  $^{\circ}$ C 退火,72  $^{\circ}$ C 延伸,共 25 个循环。将 PCR 产物进行琼脂糖电泳鉴定。

## 2 结果

### 2.1 HSV-TK 基因逆转录病毒重组体的构建和鉴定

上述提取的质粒 DNA 作琼脂糖电泳,6.1 kb 的 pLNSX 载体为对照,发现有 6 个克隆(编号为 2,15,17,31,42,56)插入外源性基因,大于 6.1 kb,把这些克隆的质粒 DNA 打点于尼龙膜上,与 DIG 标记的 HSV-TK 基因 cDNA 探针进行杂交,空载体 pLNSX 作阴性对照,带 HSV-TK cDNA 的 pHSV-106 为阳性对照,证实该 6 个为阳性克隆,带有 HSV-TK 基因。用 *Sac*I 酶切鉴定重组正确的重组体形成 2 767 bp,3 094 bp 和 3 875 bp 3 个片段,表明 HSV-TK 已插入 pLNSX 质粒内构建成 pLNS-TK 重组体(图 1)。

### 2.2 重组体导入 PA317 包装细胞和筛选

用磷酸钙转染法转染 PA 317 细胞,经 G 418 筛选,形成抗 G 418 细胞克隆。按培养至第 3 周形成的细胞克隆数测定病毒(CFU)滴度为  $3 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 。



图 1 逆转录病毒重组体构建和酶切鉴定

1. *Spp*I marker
2. pHSV-106 *Bam*HI
3. pLNSX *Hind* III
4. 重组体正向插入 *Sac*I

### 2.3 PA317/TK 细胞的鉴定

提取细胞的 DNA,打点杂交证实 PA317/TK 细胞整合了 HSV-TK 基因(图 2)。

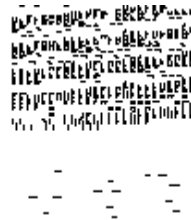


图 2 PA317/TK 细胞 DNA 打点杂交结果

1. PA317/TK
2. pHSV-106
3. pLNSX
4. 阴性对照

### 2.4 PA317/TK 细胞上清液病毒 RNA 鉴定

琼脂糖电泳结果表明经 RT-PCR 扩增的片段大小为 240 bp,与 pHSV-106 和 pLNS-TK 的 PCR 扩增片段相同,显示病毒 RNA 来自其整合的前病毒 DNA。

## 3 讨论

TK 基因是编码胸苷激酶的基因,该酶的功能是使胸苷磷酸化为一磷酸胸苷酸。本实验采用单纯疱疹病毒 I 型的 TK 基因<sup>[3,4]</sup>。1986 年 Moolten 首先提出用“自杀基因”治疗恶性肿瘤的设想,HSV-TK 基因是基因治疗中最常用“自杀基因”。其特点是引入肿瘤细胞的 HSV-TK 基因所表达的产物胸苷激酶可使抗病毒药物更昔洛韦磷酸化,转变为对肿瘤细胞的毒性药物,抑制细胞 DNA 的合成,从而杀伤肿瘤细胞。在构建逆转录病毒重组体的基础上,利用逆转录病毒载体介导 HSV-TK 基因转染肿瘤细胞,可使肿瘤细胞获得对更昔洛韦化学敏感性

而被杀死,带 HSV-TK 基因的肿瘤细胞动物模型用更昔洛韦治疗,部分实体瘤可获得完全和持久的消退<sup>[5,9]</sup>。

本实验运用基因工程技术构建了带 HSV-TK 基因的逆转病毒重组体。目的基因和载体的连接采用平端连接法,方法简单,关键在于必须选择合适的酶切位点鉴别目的基因插入的方向,我们先用打点杂交进行初步筛选,再作酶切鉴定,证明是较可靠和实用的方法。实验采用磷酸钙沉淀法介导基因转染 PA317 包装细胞,我们认为磷酸钙沉淀法具有简单可靠的特点,而且经济可行。转染成功的 PA317 细胞具有 G418 抗性,能在含 G418 的培养液中生长。本实验中,转染成功的 PA317 形成抗性克隆,用胰酶消化后扩增可在浓度为 600 mg/L 的 G418 选择培养液中生长。转染成功的 PA317 细胞可产生有感染力的逆转录病毒,逆转录病毒载体 pLNSX 在 N2 载体的基础上构建,保留了 5' 一端 LTR 序列下游包括 gag 基因前 418 bp 的 DNA 片段,可产生较高的病毒滴度,是其它载体的 10~50 倍<sup>[7]</sup>。本实验测得所产生的逆转录病毒亦达到较高的滴度( $3 \times 10^8$  L<sup>-1</sup>)。

为了证实 PA317/TK 细胞整合了 HSV-TK 基因,提取了 PA317/TK 细胞的 DNA,用 DIG 标记的 HSV-TK-DNA 进行检测,说明 PA317/TK 细胞整合了 HSV-TK 基因。并且,提取了细胞上清液的病毒 RNA,在特异性引物引导下,用反转录 PCR 扩增的产物为 240 bp,与重组体 pLNS-TK 的 PCR 扩增产物相同,显示上清液的病毒 RNA 来自整合到 PA317/TK 细胞的前病毒 DNA。本实验构建了带

HSV-TK 基因的逆转录病毒重组体,转染 PA317 细胞,建立了产生重组病毒的载体产生细胞系 PA317/TK,为开展 HSV-TK 基因治疗恶性肿瘤的实验研究提供了基础。

## 参 考 文 献

- 1 Moolten F L. Chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes; paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res*. 1986; 46:5276
- 2 Ram Z, Culver K W, Wallbridge S, *et al*. *In situ* retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res* 1993; 53:83
- 3 McKnight S L. The nucleotide sequence and transcript map of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Nucleic Acids Research*. 1980; 8:5949
- 4 Wagner M J, Sharp J A, Summers W G. Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78:1141
- 5 Moolten F L, Wells J M. Cuality of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst*, 1990; 82:297
- 6 Culver K W, Ram Z, Wallbridge S, *et al*. *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cell for treatment of experimental brain tumors. *Science*, 1992; 256:1550
- 7 Danos O, Mulligan R C. Safe and efficient generation of retrovirus with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85:6460

(1996-04-18 收稿 1997-05-29 修回)

# THE CONSTRUCTION AND IDENTIFICATION OF HSV-TK GENE RETROVIRAL VECTOR

Xie Wenlian<sup>1</sup> Liang Zhengdong<sup>2</sup> Lu Ling<sup>3</sup>

(1 Department of Urology, 2 Department of Obstetrics and Gynecology of Sun Yat-sen Memorial Hospital, 3 Molecular Medical Center of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

The recombinant retrovirus expressive vector pLNS-TK was constructed with HSV-TK cDNA and retrovirus vector pLNSX. The pLNS-TK was certified by restriction endonuclease digestion and transfected into PA317 packaging cell by calcium phosphate transfection method. The HSV-TK vector-producer cell line PA317/TK was selected in G418 medium. The virus titer was about  $3 \times 10^8$  CFU/L with NIH3T3 cells. The integration of HSV-TK cDNA into PA317 producing cells was identified by PCR method in the genomic DNA and by RT-PCR method in RNA of supernatant of PA317/TK cells. The experiment makes it possible to carry out tumor gene therapy with HSV-TK gene.

**Subject headings** simplex virus/ genetics; thymidine kinase/ genetics; retroviridae/ genetics; recombination, genetic